



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

GASTROENTEROLOGIA PEDIATRICA Y NUTRICION  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE POSGRADO

**Correlación de la Expresión de la Beta Defensina tipo 2 (H $\beta$ D-2) con el grado de inflamación según la clasificación de Sydney en biopsias de la mucosa gástrica de pacientes pediátricos con dolor abdominal recurrente infectados con *Helicobacter pylori*.**

## TESIS DE INVESTIGACION

### PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN GASTROENTEROLOGIA Y NUTRICION PEDIATRICA

Tesista: Dr. Arturo Salas Aguilera <sup>1</sup>  
Tutor: Dr. Leopoldo Muñoz Perez<sup>2</sup>  
Asesores: Dra. Judith Flores Calderón<sup>3</sup>  
Dra. Rosalinda Margarita Flores Salgado<sup>4</sup>

Servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría CMN, Siglo XXI Instituto Mexicano del Seguro Social<sup>1</sup> Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias<sup>2</sup> Servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría CMN, Siglo XXI Instituto Mexicano del Seguro Social.<sup>3</sup> Servicio de Patología del Hospital de Pediatría CMN, Siglo XXI Instituto Mexicano del Seguro Social.<sup>4</sup>

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



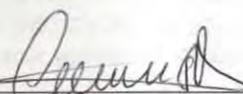
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

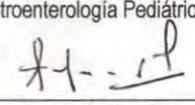
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesista

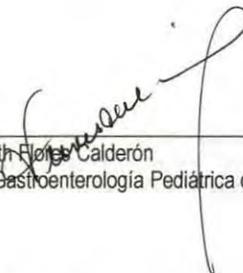
  
Dr. Arturo Salas Aguilera  
Gastroenterología Pediátrica

Asesor

  
Dr. Leopoldo Muñoz Pérez  
Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del CMNSXXI.

Comité de Examen

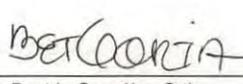
Presidente

  
Dra. Judith Flores Calderón  
Encargada del Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMNSXXI

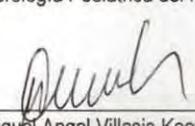
Secretario

  
Dra. Julia Rocio Herrera Márquez  
Encargada de la División de Investigación en Salud del Hospital de Pediatría del CMNSXXI

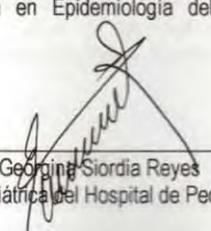
Vocal

  
Dra. Beatriz González Ortiz  
Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMN SXXI

Vocal

  
Dr. Miguel Angel Villasis Keever  
Unidad de Investigación en Epidemiología del Hospital de Pediatría del CMNSXXI

Vocal

  
Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes  
Servicio de Patología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMNSXXI

Tesista

---

Dr. Arturo Salas Aguilera  
Gastroenterología Pediátrica

Asesor

---

Dr. Leopoldo Muñoz Pérez  
Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital  
de Pediatría del CMNSXXI.

Comité de Examen

Presidente

---

Dra. Judith Flores Calderón  
Encargada del Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital de Pediatría  
del CMNSXXI

Secretario

---

Dra. Julia Rocío Herrera Márquez  
Encargada de la División de Investigación en Salud del Hospital de Pediatría del  
CMNSXXI

Vocal

---

Dra. Beatriz González Ortiz  
Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMN SXXI

Vocal

---

Dr. Miguel Angel Villasis Kever  
Unidad de Investigación en Epidemiología del Hospital de Pediatría del  
CMNSXXI

Vocal

---

Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes  
Servicio de Patología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMNSXXI

## RESUMEN

Las H $\beta$ D-2 son péptidos antimicrobianos que se expresan en la superficie del epitelio de la mucosa gástrica en presencia de infección o inflamación. *H. pylori* como causa de dolor abdominal recurrente esta presente en más del 50% de los niños mexicanos menores de 10 años, colonizando el epitelio gástrico y causando diferentes grados de inflamación a nivel de cuerpo y antro gástrico predisponiendo a desarrollar gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma en la edad adulta.

Por lo que es necesario conocer el potencial que tiene la H $\beta$ D-2 en la edad pediátrica ante la presencia de *H. pylori* y así incrementar el conocimiento sobre la participación de las mismas como parte del sistema inmune primario.

### Objetivo:

Determinar la correlación de la expresión de la H $\beta$ D-2 con el grado de inflamación según la clasificación de Sydney en biopsias de la mucosa gástrica de pacientes pediátricos con dolor abdominal recurrente infectados versus no infectados con *H. pylori*.

### Material y Métodos:

Se incluyeron un total de 50 biopsias gástricas obtenidas de pacientes pediátricos de 3 a 17 años de edad con el diagnóstico de dolor abdominal recurrente, en el servicio de gastroenterología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS. La evaluación de las diferencias en la expresión de H $\beta$ D-2 en niños infectados y no infectados se realizó con la prueba de Mann-Whitney, el Infiltrado de PMN, MN, grado de colonización y expresión de H $\beta$ D-2 se realizó con el teste de Kruskal-Wallis. La prueba de Spearman se utilizó para evaluar la correlación entre la intensidad de la inflamación y expresión de *H. pylori* con el grado de expresión de la H $\beta$ D-2.

### Resultados:

La expresión de la H $\beta$ D-2 fue significativamente más alta en las biopsias de los pacientes infectados en comparación con los no infectados ( $p < 0.001$ ) además la expresión de la H $\beta$ D-2 se relacionó significativamente con el grado de colonización ( $p < 0.001$ ) e inflamación activa ( $p < 0.001$ ) y crónica ( $p < 0.001$ ).

### Conclusiones:

Así como en los adultos, la expresión de la H $\beta$ D-2 se encuentra altamente asociada a la colonización por *H. pylori* en relación con una moderada o severo grado de inflamación en la mucosa gástrica. Por lo tanto la expresión de la H $\beta$ D-2 puede participar en la respuesta inmune inmediata en la infección de *H. pylori* en los niños.

Resumen	2
Índice	3
1. Introducción	4
2. Planteamiento del problema	9
3. Pregunta de Investigación	10
4. Hipótesis	10
5. Objetivos	10
6. Justificación	11
7. Material y Métodos	12
8. Variables	14
9. Descripción General del Estudio	19
10. Análisis	21
11. Resultados	22
12. Discusión	23
13. Bibliografía	25
14. Anexos	29

1. **Introducción.** El *Helicobacter pylori* infecta la mucosa gástrica en más del 50% de la población mundial, en México más del 85% de los adultos y el 50% de los niños mexicanos menores de 10 años de edad están colonizados (1)

En los niños la presencia de *H. pylori* como causa de dolor abdominal recurrente (DAR) es controversial, sin embargo Ozen H y colaboradores en 2001 reportaron que un 60.3% de los niños con DAR fueron positivos a *H. pylori*. Además de que el mismo ha sido identificado como la principal causa de gastritis crónica y ulcera péptica en adultos, la infección persistente predispone a desarrollar gastritis atrófica incrementando el riesgo de padecer cáncer gástrico. (2,3,4 )

Recientemente los péptidos endógenos de la mucosa gástrica han sido identificados como la clave elemental en la respuesta inmune innata del huésped contra una infección. Las defensinas constituyen uno de los péptidos antimicrobianos más sobresalientes, estas son conocidas como alfa defensinas(  $\alpha$ - defensinas) humanas y las beta defensinas (  $\beta$  – defensinas) humanas. Se conocen cinco tipos de alfa defensinas, Cuya nomenclatura llevan el nombre abreviado en iniciales seguido de su numero arábigo correspondiente. De las cuales las primeras tres (HNP-1, HNP-2 HNP-3) se expresan en los granulocitos de bazo, timo y pulmón; la alfa defensina 4 (HNP-4) se expresa en los granulocitos de cualquier sitio del organismo, mientras que la alfa defensina 5 (HNP-5) en las células de paneth del intestino y en el tracto genital. En el humano se han documentados 6 tipos de beta defensinas (H $\beta$ D-1 a 6). Encontrando expresión de H $\beta$ D- 1 en los epitelios urogenital y respiratorio. La H $\beta$ D-2 que inicialmente se aisló de las lesiones de piel en pacientes con psoriasis y que recientemente se ha visto expresada en tracto respiratorio y gastrointestinal y son fácilmente inducibles. La H $\beta$ D-3 se ha encontrado en la piel de pacientes con psoriasis, tejido cardiaco, hepático

y músculo esquelético. La H $\beta$ D-4 es regulada por la presencia de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en el epitelio respiratorio. Recientemente fueron descubiertas la H $\beta$ D-5 y la H $\beta$ D-6 que se expresan específicamente en el epidídimo. (5,6,7,8)

De estas las H $\beta$ D-2 juegan un papel importante como mecanismo de defensa primaria en la mucosa gástrica en contra de bacterias Gram negativas como lo es *H. pylori*. (9) La H $\beta$ D-2 se encuentra en el epitelio de las superficies internas y externas del cuerpo humano, tales como la piel, pulmón, tráquea y el tracto gastro intestinal. Estas necesitan de un estímulo para ser inducidas como alguna bacteria, factor de necrosis tumoral o inducidas por citocinas pro-inflamatorias como la Interleucina 1- $\alpha$  que después de ser activada ejercen un efecto inhibitorio en contra el crecimiento de las bacterias, sin conocer aun la cantidad de péptidos necesarias para este fin (10).

La H $\beta$ D-2 es un producto del hospedero que tiene actividad microbicida y puede controlar importantes funciones ya que su expresión genética esta bien regulada. La expresión de H $\beta$ D-2 es inducida por estímulos infecciosos como *Candida albicans*, bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, así como por estímulos inflamatorios (interleucina 1, factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , LPS y otros glicolípidos). (11)

La H $\beta$ D-2 tiene características que le confieren un efecto microbicida que radica en su atracción electrostática entre el péptido catiónico y la membrana aniónica del microorganismo, provocando la formación de poros en la membrana del microorganismo interrumpiendo el metabolismo bacteriano e interferencia en su biosíntesis.

La actividad microbicida de la H $\beta$ D-2 depende de la permeabilización de la bicapa lipídica. Además se ha observado que la resistencia bacteriana a los péptidos antimicrobianos es un fenómeno bastante raro.

El efecto inmunomodulador de la H $\beta$ D-2 es amplio, Según Bevins, y colaboradores, a nivel intestinal las defensinas protegen a las células de paneth de invasión microbiana y parasitaria, influyen en la flora normal del intestino y son quimiotácticas (12)

O'Neil y colaboradores han demostrado la asociación que tiene la expresión de la H $\beta$ D-2 con el factor quimiotáctico específico (CCR6) facilitando la acción de "puente" que tienen estos péptidos entre la fase innata y la fase adaptativa de la respuesta inmune de la mucosa intestinal. La expresión de las H $\beta$ D-2 es estrictamente regulada por los complejos intestinales epiteliales Toll/IL-1, interleucina-1, enterobacterias pero no por endotoxinas (13)

Hamanak y colaboradores, encontraron en seis pacientes con *H. pylori* altos niveles de mRNA de H $\beta$ D-2 en la mucosa gástrica, mientras que el mRNA de las mismas no fueron detectadas cuando la biopsia era negativa a *H. pylori*, la inmunohistoquímica reveló la expresión de la H $\beta$ D-2 en la mucosa infectada por *H. pylori* y después de erradicar a la bacteria la expresión de H $\beta$ D-2 disminuyó dramáticamente. In vitro demostraron que la H $\beta$ D-2 inhibió la proliferación de *H. pylori* en todas las muestras (14).

Nishi y colaboradores, Refieren haber encontrado altas concentraciones de H $\beta$ D-2 en el jugo gástrico de pacientes con gastritis crónica y ulcera gástrica relacionados con la presencia de *H. pylori* en comparación con grupos de control no infectados con *H. pylori* (15). Elliot y colaboradores, en un estudio con 10 pacientes infectados con *H. pylori* encontraron en las biopsias una alta expresión de H $\beta$ D-2 mediante la técnica de PCR e inmunohistoquímica mientras que en el grupo control de 12 sujetos no infectados las H $\beta$ D-2 fueron indetectables (16).

Se ha evidenciado en la mucosa nasal que las H $\beta$ D-2 pueden inducir la activación de Inmunoglobulina del isotipo IgG a través de CD4. Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> al promover la interacción de

células B y T, establecen una relación entre el sistema inmune innato y el adquirido. Además se ha observado la presencia de H $\beta$ D-2 inducida por *H. pylori* en pacientes con cáncer gástrico en líneas celulares MKN 45 y AGS.

Kawauchi y colaboradores, de manera similar también demostraron mediante inmunohistoquímica y transcripción reversa de la polimerasa la expresión de la H $\beta$ D-3 en pacientes con inflamación y con cáncer de la mucosa gástrica. Concluyendo que la expresión de la H $\beta$ D-3 fue significativamente más alta en muestras con *H. pylori* positivo que en los que tenían *H. pylori* negativo. Además de que inhibió completamente su crecimiento (17,18)

Estudios similares por inmunohistoquímica han demostrado la inducción de las  $\beta$ -defensinas in Vitro y su relación con el grado de inflamación de la mucosa gástrica (19,20); como lo realizado por Bekem y colaboradores quienes reportan una expresión de alfa defensinas significativamente alta en pacientes infectados con *H. pylori* en comparación con pacientes sin infección por la bacteria. (100% vs 12% respectivamente;  $P < 0.001$ ). Expresión significativamente asociada con altos grados de inflamación crónica y densidad neutrofílica según la clasificación de Sydney. (21,22,23,24,25)

Todos los estudios hasta la actualidad están enfocados a pacientes adultos con enfermedades originadas por *H. pylori* demostrando la función inhibidora e inmunomoduladora de la H $\beta$ D-2 sobre la bacteria.

Muñoz y colaboradores, en su estudio realizado con niños mexicanos afirman que estos responden ante la infección de *H. pylori* con una leve respuesta inflamatoria, un incremento balanceado entre linfocito T y B y una alta actividad de regeneración celular (26) Considerando es necesario conocer el potencial que tienen la I H $\beta$ D-2 sobre la bacteria en los niños

## 2. Planteamiento del Problema.

El *H. pylori* es una bacteria Gram negativa que infecta a más de la mitad de la población adulta en el mundo. La infección se inicia en la infancia, en ese tiempo puede ser asintomática o provocar dolor abdominal recurrente, para después de varios años ser la causa principal de gastritis crónica, úlcera péptica e incrementar el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

Recientemente se han descubierto ciertas propiedades en la mucosa gástrica que funcionan como defensa en contra de bacterias Gram negativas como *H. pylori* estos son los péptidos endógenos llamadas defensinas.

Aunque según Bevis y colaboradores, una buena respuesta inmunomoduladora esta relacionada con la maduración del sistema inmune. Actualmente no se ha evidenciado la expresión de la H $\beta$ D-2 en pacientes pediátricos y mucho menos ante la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica. Por lo que es necesario conocer el potencial que tienen la H $\beta$ D-2 en la edad pediátrica ante la presencia de *H. pylori* y así crear las bases de métodos terapéuticos a ese nivel y evitar que se desarrollen las patologías asociadas en la edad adulta.

### **3. Pregunta de Investigación.**

¿Existe Correlación de la Expresión de la H $\beta$ D-2 con el grado de inflamación según la clasificación de Sydney en biopsias de la mucosa gástrica de pacientes pediátricos con dolor abdominal recurrente infectados con *H. pylori*?

### **4. Hipótesis**

4.1 La mayor expresión de H $\beta$ D-2 en las biopsias de mucosa gástrica de pacientes pediátricos se relaciona con mayor grado de inflamación según la clasificación de Sydney.

4.2 La mayor expresión de H $\beta$ D-2 en las biopsias de mucosa gástrica de pacientes pediátricos se relaciona con mayor grado de densidad de colonización de *H. pylori* según la clasificación de Sydney.

### **5. Objetivos**

#### 5.1 Objetivo General.

Determinar la correlación de la expresión de la H $\beta$ D-2 con el grado de inflamación según la clasificación de Sydney en biopsias de la mucosa gástrica de pacientes pediátricos con dolor abdominal recurrente infectados con *Helicobacter pylori*.

#### 5.2 Objetivos específicos:

5.2.1 Determinar la expresión de la H $\beta$ D-2 en la muestra de la biopsia gástrica de pacientes pediátricos infectados con *H. pylori*

5.2.2 Determinar la expresión de la H $\beta$ D-2 en la muestra de la biopsia gástrica de pacientes pediátricos no infectados con *H. pylori*

5.2.3 Determinar la relación de la expresión de la H $\beta$ D-2 con el grado de inflamación según la clasificación de Sydney en la muestra de la biopsia gástrica de pacientes pediátricos infectados y no infectados con *H. pylori*.

## **6. Justificación.**

Todos los estudios hasta la actualidad están enfocados a pacientes adultos con enfermedades originadas por *H. pylori* demostrando la función inhibitoria e inmunomoduladora de la H $\beta$ D-2 sobre la bacteria.

Actualmente no se conoce la existencia de la expresión de la H $\beta$ D-2 en pacientes pediátricos y mucho menos ante la presencia de *H. pylori* el cual no originaría síntomas graves si no hasta la edad adulta. Por lo que es necesario conocer el potencial que tiene la H $\beta$ D-2 en la edad pediátrica ante la presencia de *H. pylori* y así incrementar el conocimiento sobre la participación de las mismas como parte del sistema inmune primario

## **7. Material y métodos**

### 7.1 Lugar

Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

### 7.2 Diseño

Observacional, Transversal, Analítico, Ambispectivo, Comparativo.

### 7.3 Universo de estudio

Pacientes pediátricos con biopsias gástricas con diagnóstico de dolor abdominal recurrente realizadas entre los años 1995 a 2007 por endoscopia por el servicio de gastroenterología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS

### 7.4 Criterios de Inclusión

- a) Pacientes de edades de 3 a 17 años
- b) Pacientes con dolor abdominal recurrente definido como la presencia de un mínimo de tres o más episodios de dolor abdominal lo suficientemente intensos para interferir con la actividad diaria, en un periodo mayor de tres meses y en el que se han descartado causas orgánicas que los expliquen.
- c) Pacientes en quien previamente se haya documentado la presencia de H. pylori en la inmunohistoquímica por patólogo experimentado en reporte del expediente.
- d) Pacientes en quien previamente se haya documentado la ausencia de H. pylori en la inmunohistoquímica por patólogo experimentado en reporte del expediente.

e) Pacientes quien previamente se haya documentado en expediente la realización de cultivo de biopsia, prueba de aliento y serología para *H. pylori* con resultados positivos.

f) Pacientes quien previamente se haya documentado en expediente la realización de cultivo de biopsia, prueba de aliento y serología para *H. pylori* con resultados negativos.

#### 7.5 Criterios de exclusión

a) Pacientes con dolor abdominal recurrente con causas orgánicas.

b) Pacientes que recibieron tratamiento para *H. pylori* alguna vez en su vida.

c) Pacientes quien previamente no se encuentro documentado en su expediente la realización de cultivo de biopsia, prueba de aliento y serología para *H. pylori*.

#### 7.6 Criterios de eliminación

a) Biopsias de pacientes en las que no se visualizaba el material morfométrico.

b) Biopsias con tejido con problemas de conservación para el estudio de inmunohistoquímica (falsos negativos).

#### 7.7 Tamaño de la Muestra

El tamaño de la muestra se calculó considerando que la prevalencia de infección por *H. pylori* en niños con DAR es de 25% y tomando un nivel de confiabilidad del 95%, el tamaño de la muestra fue de 18 pacientes infectados y de 18 pacientes no infectados.

## 8. Variables

Tipo de Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala de Medición	Unidades de Medición
<b>Dependiente</b>				
<b>Cantidad de Beta Defensinas (H<math>\beta</math>D-2)</b>	Péptidos catiónicos con seis residuos de cisteína conectados entre si por tres puentes de disulfuro los cuales forman parte de la inmunidad innata presentes en piel, tracto respiratorio e intestinal de los mamíferos. CITA:( 4 )	Péptidos catiónicos observados al microscopio por tinción. La tinción en color café en la superficie del epitelio gástrico se considerará una tinción positiva, la densidad se cuantificara en unidad IOD.El cual es dado por un analizador de imágenes de densidad optica. (Paket KS 300 Rel. 3.0, Karl Zeiss)	Cuantitativa	<b>IOD(Integrated optical density)</b>
<b>Independiente</b>				
<b><i>Helicobacter pylori</i></b>	Bacteria Gram negativa de lento crecimiento, de forma espiral y flagelada, habita en ambiente microaerofílico, su principal producto enzimático es la ureasa que le permite permanecer en la mucosa gástrica CITA: (14 )	Presencia de Bacteria Gram negativa en la tinción por inmunohistoquímica de la muestra de epitelio gastrointestinal observada de aspecto curvada con seis flagelos unipolares cubiertos por una membrana y terminación bulbar. Su presencia se graduara según lo establecido en la clasificación de Sydney en 0:nada, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso.	Cualitativa Ordinal Politémica	<b>Grados del 0 al 3</b> Expresión (Sydney) 0: nada, 1: leve, 2:moderado 3: intenso.

<b>Grados morfológicos en las muestras de la mucosa gástrica</b>	Apariencia histopatológica de la muestra de mucosa gástrica observada mediante microscopio. Determinándose grados morfológicos de diferente magnitud según las características establecidas en la clasificación de Sydney.	Apariencia histopatológica de la muestra de mucosa gástrica observada mediante microscopio. Determinándose los dos primeros grados morfológicos según lo establece la clasificación de Sydney. 1) Actividad Neutrófila 2) Actividad de Mononucleares (crónica)	Cualitativa Ordinal Politémica	<b>Grados del 0 al 3</b>
--	--	--	--------------------------------	--------------------------

## 8.1 Descripción de las Variables

### 8.1.1 DEPENDIENTES

**Variable:** Beta defensina tipo 2 (H $\beta$ D-2)

**Definición Conceptual:** Péptidos catiónicos con seis residuos de cisteína conectados entre sí por tres puentes de disulfuro los cuales forman parte de la inmunidad innata presentes en piel, tracto respiratorio e intestinal de los mamíferos.

**Definición Operacional:** Péptidos catiónicos observados al microscopio por tinción. La tinción en color café en la superficie del epitelio gástrico se consideró una tinción positiva, la densidad se asignó en unidades IOD (Integrated Optical Density). El cual fue dado por un analizador de imágenes de densidad óptica. (Paket KS 300 Rel. 3.0, Karl Zeiss)

**Escala de Medición:** Cuantitativa.

**Unidades de Medición:** La tinción en color café en la superficie del epitelio gástrico se considerara una tinción positiva y se cuantifico en unidades IOD.

### 8.2.1 INDEPENDIENTES

**Variable:** *Helicobacter Pylori*

**Definición Conceptual:** Bacteria Gram negativa de lento crecimiento, de forma espiral y flagelada, habita en ambiente microaerofílico, su principal producto enzimático es la ureasa que le permite permanecer en la mucosa gástrica.

**a)Definición Operacional:** Presencia de Bacteria Gram negativa en la tinción por inmunohistoquímica de la muestra de epitelio gastrointestinal observada de aspecto curvada con seis flagelos unipolares cubiertos por una membrana y terminación bulbar.

**Escala de Medición:** Cualitativa, Ordinal, politómica

**Unidades de Medición:** Grados del 0 al 3. Su presencia o expresión se graduó según lo establecido en la clasificación de Sydney en 0:nada, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso

**Variable:** Grados morfológicos en las muestras de la mucosa gástrica

**Definición Conceptual:** Apariencia histopatológica de la muestra de mucosa gástrica observada mediante microscopio. Determinándose grados morfológicos de diferente magnitud según las características establecidas en la clasificación de Sydney.

1) Actividad Neutrofílica: Neutrófilos que fueron vistos en la lámina propia, En la superficie del epitelio en donde lo pueden erosionar o formar abscesos o dentro del epitelio particularmente en el cuello de las glándulas.

**Escala de Medición:** Cualitativa, Ordinal, politómica

**Unidades de Medición:** Grados del 0 al 3. Su presencia se graduó según lo establecido en la clasificación de Sydney en 0:nada, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso.

2) Actividad de Mononucleares: Presencia de células mononucleares dispersadas en la lámina propia, pueden estar presentes algunos leucocitos mononucleares. Considerándose grado 0 la presencia de 2 a 5 células por campo.

**Escala de Medición:** Cualitativa, Ordinal , politomica

**Unidades de Medición:** Grados del 0 al 3. Su presencia se graduó según lo establecido en la clasificación de Sydney en 0:nada, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso.

## 9. Descripción General del Estudio

El universo de estudio fue de 90 pacientes con diagnóstico de Dolor abdominal recurrente a quienes se les había realizado una biopsia gástrica y contaban con reporte histopatológico por el servicio de patología además de reportes de cultivo, prueba de aliento y serología en su expediente.

En 30 pacientes se identificó reporte previo de patología, cultivo, prueba de aliento y serología positiva para *H. pylori*.

En 60 pacientes se identificó reporte previo de citología, cultivo, prueba de aliento y serología negativo para *H. pylori*.

Se calculó el tamaño de la muestra considerando que la prevalencia de infección por *H. pylori* es del 25% y tomando un nivel de confiabilidad del 95%, el tamaño de la muestra fue de 18 pacientes infectados y 18 pacientes no infectados por dicha bacteria.

Se consideró paciente infectado aquel con reporte previo de patología, cultivo, prueba de aliento y serología positivos para *H. pylori*.

Se consideró paciente no infectado con reporte previo de patología, cultivo, prueba de aliento y serología negativos para *H. pylori*.

Se recabaron todas las biopsias en laminillas en el departamento de Patología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMNSXXI, las cuales contaban con tinción de hematoxilina y eosina y fueron analizadas por patólogo experimentado desconociendo el reporte previo y los resultados de los demás estudios corroborando la presencia de *H. pylori* en 25 biopsias y la ausencia de la bacteria en 25 biopsias. El resto de las laminillas mostraron material dañado que no permitieron visualizar adecuadamente las características tisulares a evaluar. No se determinó la concordancia inter e intraobservador. Después de analizar las 50 biopsias por el servicio de patología se continúa su estudio en la Unidad de Investigación de enfermedades infecciosas y

parasitarias del Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI en donde se realizó el estudio de inmunohistoquímica con sistema peroxidasa-antiperoxidasa.

- 1) En cada una de las biopsias se bloqueó la actividad endógena de la peroxidasa con agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) al 3%. Después se unieron con suero de cabra al 1.5% en albúmina sérica bovina al 3.5% durante 60 min, se lavaron por 5 veces con PBS pH 7.4, posteriormente a las 50 biopsias (25 infectadas y 25 no infectadas) se les agregó un anticuerpo anti-H $\beta$ D-2 policlonal de cabra (Santa cruz biotechnology) a una dilución 1:200 (anticuerpo primario), se incubó a 4° C durante toda la noche al día siguiente, se le agregó un anticuerpo anti-cabra biotinilado, (anticuerpo secundario) posteriormente se adicionó un complejo avidina-peroxidasa por 30 minutos a 37°C (Bajal-Elliott., 2002).
- 2) Una vez adicionado el sustrato (3-3'-diaminobencidina) y desarrollado el color, la tinción se contrastó con hematoxilina y se calculó el área de detección de la H $\beta$ D-2 en 200  $\mu$  de la biopsia gástrica evaluada con la ayuda de un programa para analizar imágenes (Image-Pro plus vers 6.3, conectado a un microscopio Olympus MP).
- 3) Se escogieron de manera aleatoria 3 campos de alto poder para cada biopsia. La tinción en color café en la superficie del epitelio gástrico se consideró tinción positiva para H $\beta$ D-2, la densidad de la tinción de cada biopsia se midió en pixeles/200 $\mu$  de tejido evaluado por un analizador de imágenes de densidad óptica. Los resultados de densidad de detección de las H $\beta$ D-2 se cuantificó en unidades IOD (pixeles/200 $\mu$ ).
- 4) Se realizó como control positivo conocido biopsias de piel previamente almacenadas en el laboratorio de la unidad de enfermedades infecciosas y parasitarias del CMNSXXI.

5) El resultado de la graduación de las H $\beta$ D-2 de cada biopsia se correlacionó con el parámetro histológico de Sydney, según fue el caso:

a) Actividad Neutrófila: Grados del 0 al 3. Su presencia se graduó según lo establecido en la clasificación de Sydney en 0:nada, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso.

b) Actividad de Mononucleares : su presencia se graduó según lo establecido en la clasificación de Sydney en 0: nada, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso.

c) *H. Pylori* : Su presencia (expresión) se graduó según lo establecido en la clasificación de Sydney en 0:nada, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso.

## 10. Análisis Estadístico

La evaluación de las diferencias en la expresión de H $\beta$ D-2 en biopsias infectadas y no infectadas se realizó con la prueba de Mann-Whitney, el Infiltrado de PMN y expresión de H $\beta$ D-2, el Infiltrado de MN y expresión de H $\beta$ D-2, Grado de colonización y expresión de H $\beta$ D-2 se realizó con Kruskal-Wallis test. La prueba de Spearman se utilizó para evaluar la correlación entre la intensidad de la inflamación y la expresión de *H. pylori* con el grado de expresión de la H $\beta$ D-2. El análisis estadístico se realizó mediante programas computacionales SPSS versión 17 y Graph Pad Prism 6.01.

## 11. Resultados.

La expresión de H $\beta$ D-2 se observó en 8 de las biopsias de las 25 muestras no infectadas y en 22 de las 25 infectadas. En el grupo de las no infectadas estuvo ausente la inflamación por actividad neutrofílica (PMN), mientras que en las infectadas predominó la inflamación con actividad neutrofílica moderada en un 52% y actividad de mononucleares moderada en un 52%. (Tabla 1 y 2 )

En el grupo de las biopsias infectadas con expresión de H $\beta$ D-2 se encontró una actividad inflamatoria de mononucleares leve de 24%, moderada de 40% y severa de 20%. Además de una actividad inflamatoria de neutrófilos leve de 24%, moderada de 48% y severa de 16%. (Tabla 3 )

La expresión de H $\beta$ D-2 fue significativamente más alta en las biopsias de las muestras infectadas en comparación con las no infectadas ( $p < 0.001$ ) por la prueba de Mann-Whitney.

La expresión de la H $\beta$ D-2 se relacionó significativamente con el grado de expresión de *H. pylori* ( $p < 0.001$ ) e inflamación por polimorfonucleares ( $p < 0.001$ ) y mononucleares ( $p < 0.001$ ) según la prueba de Kruskal-Wallis.

La correlación entre la expresión de H $\beta$ D-2 con la expresión de *H. pylori* y la correlación entre la expresión de H $\beta$ D-2 con los grados de inflamación fueron estadísticamente significativa ( $\rho = 0.6$ ) según la prueba de Spearman. (Fig 1 a 6).

## 11. DISCUSION

La inmadurez del sistema gastrointestinal en los niños le confiere diferentes características a la del adulto, además que la prevalencia en nuestro país de *H. pylori* en los primeros es elevada. Motivo por lo cual nosotros nos propusimos la tarea de establecer una correlación entre la respuesta inmune innata (H $\beta$ D-2) y la infección de *H. pylori* a nivel gastrointestinal en pacientes pediátricos (2,3)

Estudios recientes han demostrado que los adultos infectados por *H. pylori* expresan niveles elevados de  $\alpha$  y  $\beta$  defensinas, los cuales son reducidos de manera importante después de completar un tratamiento de erradicación para la infección. Además de que el mRNA de las H $\beta$ D-2 es inducido en respuesta a agentes infecciosos que no siempre son *H. pylori*.

El rol de las defensinas en la erradicación de *H. pylori* es controversial. Algunos estudios han sugerido que los altos niveles de  $\alpha$  y  $\beta$  defensinas en pacientes con gastritis crónica activa indican que estos péptidos no son suficientes para erradicar *H. pylori*. Así mismo se ha propuesto que las cepas de *H. pylori* que causan una gastritis crónica activa son menos susceptibles a esos péptidos. Aunque nosotros no evaluamos en conjunto la expresión de las  $\alpha$  y  $\beta$  defensinas, si encontramos una expresión de correlación entre la presencia de *H. pylori*, el grado de inflamación y la expresión de las H $\beta$ D-2 en niños (4,7, 21, 29)

En este estudio nosotros detectamos la expresión de las H $\beta$ D-2 en 88% de los casos positivos para *H. pylori*. Esto demuestra, al igual que en los pacientes adultos, que la infección por *H. pylori* activa la expresión de estos péptidos en niños con gastritis crónica (7). Hemos observado

también que la actividad neutrofílica y la inflamación crónica fue significativamente más severa en las biopsias de los pacientes con presencia de H $\beta$ D-2 . Fundamentando según lo referido por Bajaj y colaboradores quienes observaron una alta correlación entre la expresión de las H $\beta$ D-2 y los complejos intestinales epiteliales Toll/ interleucinas como precursores de la inflamación (13).

Existen algunas limitaciones en el presente estudio. La evaluación de las biopsias aunque fue realizada por un histopatólogo experto, no deja de ser una evaluación subjetiva, y semicuantitativa y está sujeta a discordancia inter-observador y reducir la significancia estadística. Existen otras variables además de *H. pylori*, que también pueden inducir la expresión de las H $\beta$ D-2 como la interleucinas, presentes en la mucosa gástrica, las cuales no fueron determinadas. A pesar de estas limitaciones nosotros encontramos un gran diferencia significativa entre la expresión de las H $\beta$ D-2 y los casos positivos y negativos de *H. pylori*.

Sugiriendo para estudios posteriores la optimización de recursos para la realización la medición de las concentraciones de H $\beta$ D-2 por PCR obteniendo una apreciación más objetiva de su expresión.

En conclusión, así como en los adultos, la expresión de la H $\beta$ D-2 se encuentra altamente asociada a la colonización por *H. pylori* en relación con una moderada o severo grado de inflamación en la mucosa gástrica. Por lo tanto la expresión de la H $\beta$ D-2 puede participar en la respuesta inmune inmediata en la infección de *H. pylori* en los niños.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Torres J, Perez G, Leal Y, et al. Infection with CagA<sup>+</sup> *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *Int J Cancer* 1998; 78: 298-300
- 2) Gold B, Colletti R, Abbott M, et al. *Helicobacter pylori* Infection in Children: Recommendations for Diagnosis and Treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 31: 490-497.
- 3) Sherman P, Czinn S, Drumm B, et al. *Helicobacter pylori* Infection in Children and Adolescents: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35(suppl 2):128-133.
- 4) Wehkamp J, Schmidt K, Herrlinger K, et al. Defensin pattern in chronic gastritis: H $\beta$ D-2 is differentially expressed with respect to *Helicobacter pylori* status. *J Clin Pathol* 2003;56:352-357.
- 5) Boman H. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 2003; 254: 197-215.
- 6) Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human  $\beta$ -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumor necrosis factor -  $\alpha$ - treated human neutrophils. *Immunology* 2004; 111: 273-281.

- 7) Wehkamp J, Schwind B, Herrlinger K, et al. *Innate Immunity and Colonic Inflammation. Enhanced Expression of Epithelial  $\alpha$ -Defensins. Dig Dis Sci 2002; 47:1349-1355.*
  
- 8) Rivas B, Sada E, Hernandez R, et al. *Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. Salud Pub Mex 2006;48:62-71.*
  
- 9) O'Neil D, Cole S, Porter M, et al. *Regulation of Human  $\beta$ -Defensins by gastric epithelial cells in response to infection with Helicobacter pylori or stimulation with interleukin-1. Infect Immun 2000;68:5412-5415.*
  
- 10) Uehara N, Yagihashi A, Kondoh, et al. *Human  $\beta$ -defensin-2 inductions in Helicobacter pylori-infected gastric mucosal tissues: antimicrobial effect of overexpression. J Med Microbiol 2003;52:41-45.*
  
- 11) Lillard J, Boyaka P, Chertov O, et al. *Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. Immunol 1999;96:651-656.*
  
- 12) Bevins C, Porter M and Ganz T. *Defensins and Innate host defence of the gastrointestinal tract. Gut 1999;45:911-915.*
  
- 13) O'Neil D. *Regulatory mechanisms which govern enteric (beta)-defensin expression. Immunology 2002; 107(suppl 1):34.*

- 14) Hamanakaka Y, Nakashimina M, Wada A, et al. Expression of human  $\beta$ -defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001;49:481-487
- 15) Nishi Y, Isomoto H, Mukae H, et al. Concentrations of  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins in gastric juice of patients with various gastroduodenal diseases. *World J Gastroenterol* 2005; 11:99-103.
- 16) Elliot B, Fedeli P, Smith G, et al. Modulation of host antimicrobial peptide ( $\beta$ -defensins 1 and 2) expression during gastritis. *Gut* 2002;51:356-361
- 17) Biragyn A. Defensins-non-antibiotic Use for vaccine development. *Curr Protein and peptide science* 2005; 6:53-60.
- 18) Kawauchi K, Yagihashi A, Tsuji N, et al. human  $\beta$ -defensin-3 induction in *H pylori*-infected gastric mucosal tissues. *World J Gastroenterol* 2006; 12:5793-5797.
- 19) Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, et al. High concentrations of human  $\beta$ -defensin 2 in gastric juice of patients with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2005;11:4782-4787
- 20) Cunliffe R, Rose F, Keyte J, et al. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48: 176-185.
- 21) Llet W. A method for staining both Gram positive and Gram negative bacteria in sections. *Pathol and Bacteriol* 1947; 59: 357.
- 22) Bekem S, Ozturk Y, Ozer E.  $\alpha$ -Defensin Expression in the Gastric Tissue of Children with *Helicobacter pylori*- Associated Chronic Gastritis: An Immunohistochemical Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;4: 474-477.

- 23) Vordenbaumen S, Pilic D, Otte J, et al. Defensins are differentially expressed with respect to the anatomic region in the upper gastrointestinal tract of children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:123-6.
- 24) Taha AS, Faccenda E, Angerson WJ. Gastric epithelial antimicrobial peptides, histological correlation and influence of anatomical site and peptic ulcer disease. *Dig Liver Dis* 2005; 37:51-6.
- 25) Dixon M, Path F, Genta R, et al. Classification and Grading of Gastritis : the Updated Sydney System. *J Clin Pathol* 1996;20:1161-1181.
- 26) Muñoz L, Camorlinga M, Hernández R, et al. Immune and proliferative celular responses to *helicobacter pylori* infection in the gastric mucosa of mexican children. *Helicobacter* 2007;12:224-230.

ANEXOS

Tabla 1. Relación entre el grado de actividad de Mononucleares y la densidad de *H. pylori* en las biopsias gástricas de pacientes pediátricos con dolor abdominal recurrente.

<u>Actividad de Mononucleares</u>	<u><i>H. pylori</i></u>				<u>Total</u>
	<u>Nada</u>	<u>Leve</u>	<u>Moderada</u>	<u>Intensa</u>	
Sin inflamación crónica	-	1	-	-	1
Inflamación crónica leve	-	4	3	-	7
Inflamación crónica moderada	-	4	8	-	12
Inflamación crónica intensa	-	-	2	3	5
Total	0	9	13	3	25

Tabla 2. Relación entre el grado de actividad neutrofílica (inflamación activa) y la densidad de *H. pylori* en las biopsias gástricas de pacientes pediátricos con dolor abdominal recurrente.

<u>Actividad Neutrofílica</u>	<u><i>H. pylori</i></u>				<u>Total</u>
	<u>Nada</u>	<u>Leve</u>	<u>Moderada</u>	<u>Intensa</u>	
Sin Actividad neutrofílica	-	-	-	-	-
Actividad neutrofílica leve	-	6	1	-	7
Actividad neutrofílica Moderada	-	3	11	-	14
Actividad neutrofílica Intensa	-	-	1	3	4
Total	0	9	13	3	25

Tabla 3. Relación de la expresión de la H $\beta$ D-2 con los parámetros histológicos (Mann-Whitney)

	Positivas para H $\beta$ D-2	Negativas para H $\beta$ D-2	$p$
<b>Negativas a <i>H. pylori</i> (n=25)</b>	8	17	
Infiltración Mononucleares			
Nada	2	3	
Leve	6	14	
Moderada	-	-	
Severa	-	-	<0.001
<b>Positivas a <i>H. pylori</i> (n=25)</b>			
Leve	7	2	
Moderada	12	1	
Severa	3	-	<0.001
Infiltración Mononucleares			
Nada	1	-	
Leve	6	1	
Moderada	10	2	
Severa	5	-	<0.001
Infiltración Neutrófilos			
Nada	0	-	
Leve	6	1	
Moderada	12	2	
Severa	4	-	<0.001

Tabla 4. Relación de la expresión de la H $\beta$ D-2 con los parámetros histológicos (Sydney) en biopsias con *H. pylori* negativas ( serología, UBT, cultivo negativos para *H. pylori*)

Folio de Biopsias	Grado de Colonización por H $\beta$ D-2 (IOD)	Mononucleares
609-01-3	0	1
367-96-3	29	1
1225-96-3	0	1
1774-99-3	0	0
606-99-3	0	1
221-99-3	0	1
1286-00-3	0	1
1222-002	60	0
559-00-3	0	0
445-00-3	79	0
623-00-3	63	1
367-00-3	0	1
1441-00-3	7	1
760-01-3	58	1
801-01-3	0	1
731-01-3	0	1
609-01-3	0	1
205-01-3	0	1
449-00-3	0	1
473-01-3	0	0
609-01-3	0	1
632-00-3	0	1
686-99-3	90	1
670-96-3	58	1
1948-99-3	0	1

Tabla 5. Relación de la expresión de la H $\beta$ D-2 con los parámetros histológicos ( Sydney) en biopsias con *H. pylori* positivas.

Folio de Biopsias	Grado de Colonización Por H $\beta$ D-2 (IOD)	Mononucleares	Neutrófilos	<i>H. Pylori</i>
1380-95-3	59	1	1	1
825-95-3	140	2	1	2
1721-97-3	190	2	2	2
843-98-3	98	2	2	1
2046-99-5	240	3	2	2
515-00-3	50	1	1	1
1021-00-3	0	1	1	1
168-00-3	73	3	3	3
1001-00-3	157	3	3	3
579-00-3	29	2	1	1
328-00-3	0	2	2	1
1564-00-3	175	3	2	2
166-00-3	73	2	2	2
1020-00-3	62	1	1	1
166-00-3	73	2	2	2
188-00-3	0	2	2	2
802-01-3	38	2	2	2
173-01-3	63	2	1	1
902-02-3	77	2	2	2
328-00-3	79	1	3	2
898-96-3	109	1	2	2
1063-01-3	94	3	3	3
1726-97-3	35	1	2	2
1910-97-3	58	2	2	2
2087-97-3	94	0	2	1

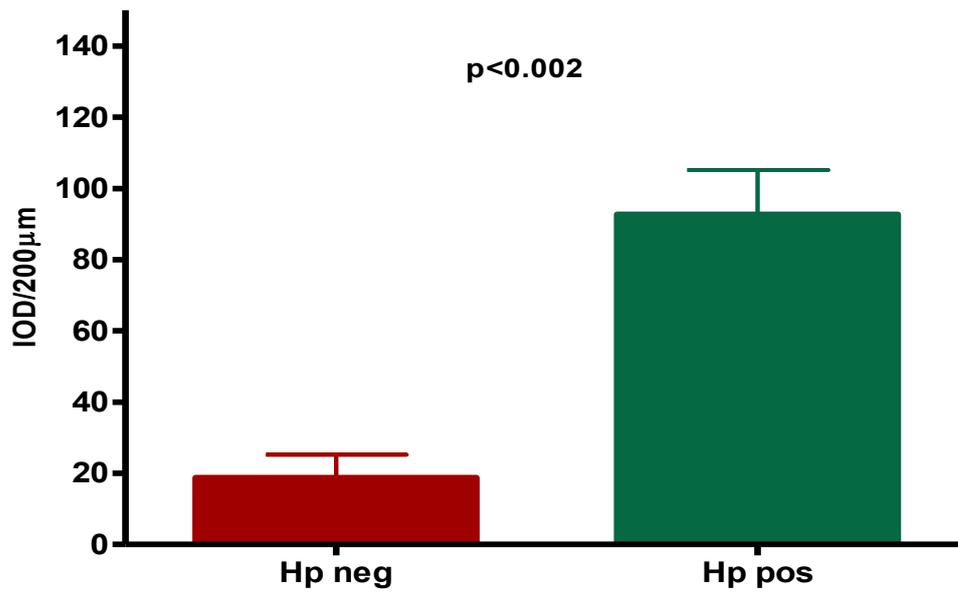


Fig 1. Expresion de BD2 en ninos infectados y no infectados por *H. pylori*

Figura 1. Relación entre la expresión de HβD-2 en niños infectados y no infectados por *H. pylori* : pixeles por 200 µm de tejido. (N = 50)





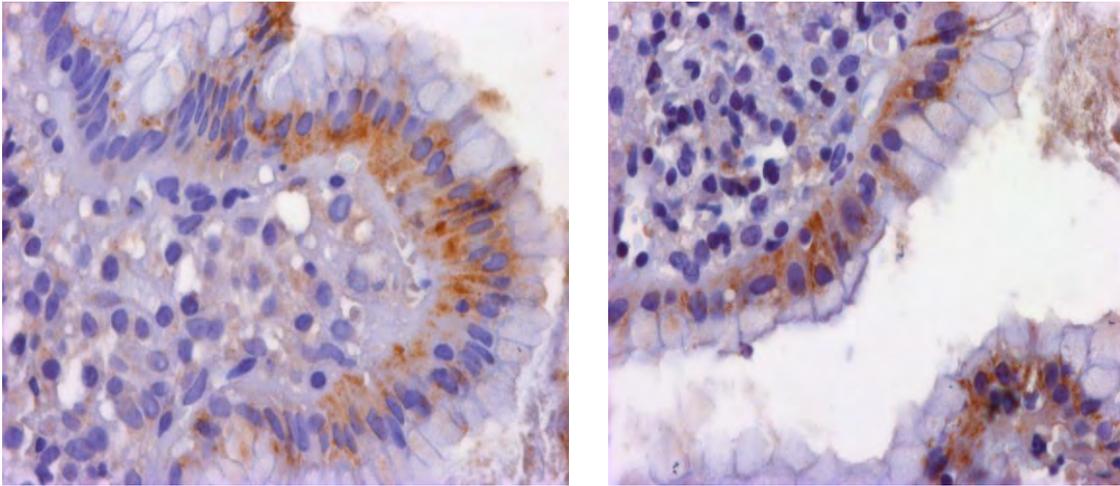


Imagen 1. Expresión de la HβD-2 en relación a el infiltrado inflamatorio en biopsias con *H. pylori*.



### Inflamación de la Mucosa gástrica

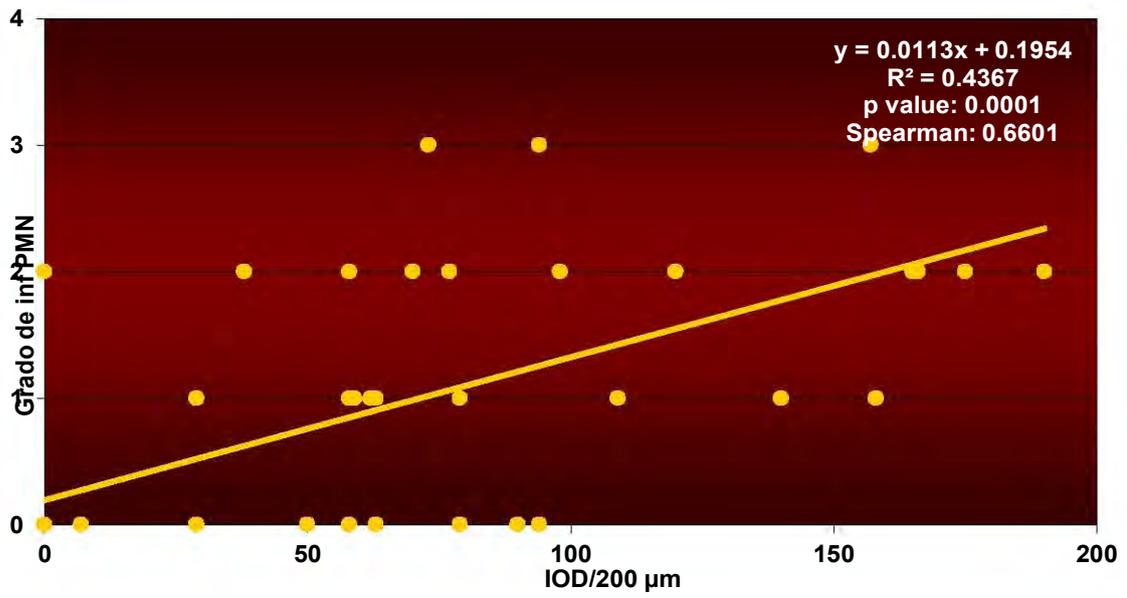


Fig. 5 Correlación entre el grado de infiltración de Polimorfonucleares y la expresión de HβD-2 en las biopsias gástricas. Expresión de HβD-2 : pixeles por 200 μm de tejido. (Spearman)

### Inflamación y Expresión de HBD2

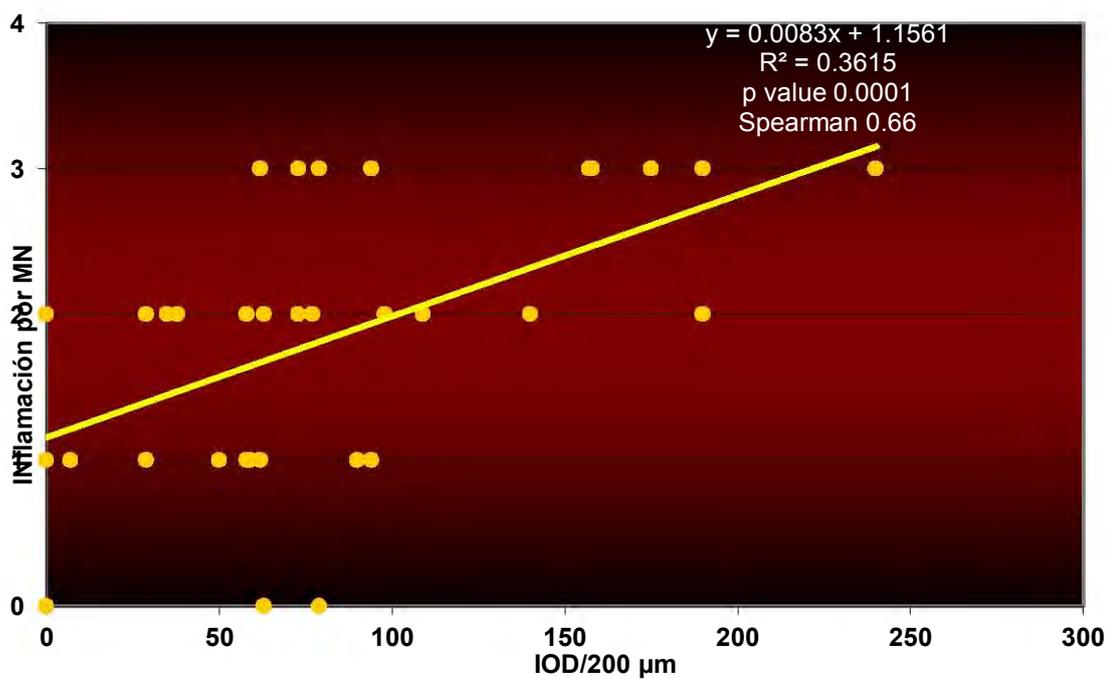


Fig. 6 Correlación entre el grado de infiltración de Mononucleares y la expresión de HBD-2 en las biopsias gástricas. Expresión de HBD-2 : pixeles por 200 μm de tejido. (Spearman)

